

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 21 JUL 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 28 139.8

**Anmeldetag:** 20. Juni 2003

**Anmelder/Inhaber:** Dade Behring Marburg GmbH,  
35041 Marburg/DE

**Bezeichnung:** Neue Oberflächenprotein- (HBsAg-) Variante des  
Hepatitis B Virus

**IPC:** C 07 K, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 15. April 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Stech

BEST AVAILABLE COPY

## **Neue Oberflächenprotein- (HBsAg-) Variante des Hepatitis B Virus**

---

Die Erfindung betrifft Sequenzen einer neuen Variante des Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) und Methoden, diese Genom- und Protein-Variante sowie dagegen gerichtete Antikörper aus Patientenproben zu detektieren.

Die neuen Sequenzen führen zu 11 noch nicht bekannten Aminosäure-Austauschen in dem Hepatitis B surface Antigen, HBsAg in den Aminosäurepositionen 96 bis 136 der Aminosäuresequenz des surface Antigens, wobei sich 10 Substitutionen in der Region der a-Determinante befinden (aa 101 bis aa 180)

Die Erfindung betrifft auch immunochemische Nachweisverfahren zum gleichzeitigen Nachweis dieser neuen HBV - Variante zusammen mit bekannten Varianten/Subtypen sowie die Verwendung der neuen Sequenzen in Verbindung mit bekannten Sequenzen zum gleichzeitigen Nachweis von HBV-spezifischen Antikörpern. Die Antigen bzw. Antikörper-Bestimmungen können jeweils in einem Testansatz differenzierend oder nicht-differenzierend durchgeführt werden.

Schließlich betrifft die Erfindung auch den Nachweis der entsprechenden Nukleinsäuren mit Hilfe sogenannter Nukleinsäure-Tests (z.B. Polymerase Chain Reaction, PCR) mit Hilfe geeigneter Primer sowie die Verwendung der neuen Aminosäuresequenzen zur Erzeugung von Impfstoffen.

Das Hepatitis B Virus ist bekanntermaßen der Auslöser einer Vielzahl von Erkrankungs-Verläufen von milden inapparenten Infektionen bis hin zu chronisch aktiven und fulminant verlaufenden durch virale Infektionen ausgelösten Leberentzündungen (Virushepatitiden).

Die chronische Infektion mit HBV stellt mit geschätzten 400 Millionen betroffenen Menschen ein globales Gesundheitsproblem dar (Lee, N. Engl. J. Med. 337; 1733-1745 (1997))

Als geeignetste Prophylaxe für die weltweit häufig anzutreffende HBV - Infektion gilt die aktive Immunisierung (Stimulation der Antikörperantwort durch Antigengabe) und auch die passive Immunisierung (durch Injektion präformierter Antikörper).

Das HBV gehört zu den Hepadna-Viren und stellt ein Viruspartikel mit einem Durchmesser von 42 nm dar, das aus Kern und Hülle besteht. Das Genom des Virus ist eine doppelsträngige, ringförmige DNA- Sequenz von etwa 3200 Nukleotiden, die mindestens sechs verschiedene virale Gene kodieren (Tiollais et al., Nature 317: 489-495 (1985)).

Es liegen vier offene Leserahmen für die Bildung der viralen Proteine vor:

Im S-Gen liegt die Information für das HBV surface Antigen (HBsAg), das auch small protein (S) genannt wird. Daneben gibt es auch größere Formen, die als large protein (L) und middle protein (M) bezeichnet werden.

Allen drei Proteinen gemeinsam ist die 226 Aminosäuren umfassende S-HBsAg Sequenz (Gerlich et al., Viral Hepatitis and Liver Disease, Hollinger et al., William-Wilkens, Baltimore, MD, pages 121-134 (1991)).

Die Proteinregionen vor dem small HBs werden auch Pre-S1 und Pre-S2 bezeichnet, umfassen 108 bzw. 55 Aminosäuren und sind beide in dem L-Protein (389 Aminosäuren) enthalten, während das M-Protein nur das Pre-S2 zusammen mit dem S-Antigen umfaßt (281 Aminosäuren). Die Pre-S Proteine weisen unterschiedliche Glykosilierungsgrade auf und tragen die Rezeptoren für die Erkennung der Leberzellen.

Das C-Gen trägt die Information für das Nukleokapsid Protein, Hepatitis B Core Antigen (HBcAg). Die Translation dieses Proteins kann bereits in der Pre-C-region starten und zur Bildung von Hepatitis B e-Antigen (HBeAg) führen. Das HBeAg weist gegenüber HBcAg eine andere Faltung und Immunogenität auf. HBeAg kommt im Gegensatz zu HBcAg frei im Serum vor und wird bei positivem Nachweis als

Indikator für die Bildung von HBcAg und damit für die Bildung infektiöser Viruspartikel angesehen.

Die im Viruspartikel enthaltene Reverse Transkriptions DNA-Polymerase wird von P-Gen codiert und für das Transaktivator X-Gen wird eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von HBV-assoziierten primären Leberzell-Karzinomen diskutiert.

Der virale Replikationszyklus von HBV umfaßt eine intrazelluläre prä-genomische RNA, die im viralen Nukleocapsid in die in DNA umgeschrieben wird. Da die HBV - eigene Reverse Transkriptase DNA- Polymerase über keine Richtigkeits-Lesefähigkeit verfügt (proof-reading capability), werden mit relativ hoher Häufigkeit falsche Nukleotide eingebaut. Als Folge weist das HBV eine Mutationsrate auf, die mit ca. 1 Nukleotid/10000 Basen/Infektionsjahr etwa dem 10-fachen dessen entspricht, was andere DNA Viren aufweisen (Blum, Digestion 56: 85-95 (1995); Okamoto et al., Jpn. J. Exp. Med. 57: 231-236 (1987)).

Daneben treten auch recht häufig Deletionen und Insertionen auf (Carman et al., Lancet 341: 349-353 (1993)).

Die resultierende Variabilität von HBV drückt sich unter anderem in dem Auftreten von 9 serologisch definierten Subtypen (Courouce et al., Bibliotheca Haematologica 42: 1 (1976) und insgesamt mindestens 6 verschiedenen Genotypen aus, die mit A bis F bezeichnet werden (Abb. 1) und eine geographische Verteilung aufweisen. (Norder et al., J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992), Norder et al., Virology 198: 489-503 (1994)).

Außerdem werden eine Reihe von Mutanten beschrieben, bei denen 1 Aminosäure oder mehrere ausgetauscht vorliegen, fehlen oder überzählig sind.

Neben natürlicherweise stattfindenden Mutationen (Cooreman et al., Hepatology 30: 1287-1292 (1999) kann eine Gabe von HBV Immunglobulinen und / oder eine antivirale Therapie (z.B. mit Lamivudine) einen sogenannten Selektionsdruck ausüben, was zum vermehrten Auftreten sogenannter „Escape-Mutanten“ führen und die Auftretens-Wahrscheinlichkeit von HBV-Mutanten deutlich erhöhen kann (Terrault et al.,

Hepatology 28: 555-561 (1998); Tillmann et al., Hepatology 30: 244-256 (1999); Hunt et al., Hepatology 31: 1037-1044 (2000).

Nicht alle HBV-Mutationen führen zu replikationsfähigen Viren und oft liegt eine Co-existenz von nicht vitalem und replikationsfähigem Virus vor, was auch die Sequenzierungs-Genauigkeit von isolierter DNA limitiert oder gar zur Nichterkennung von veränderten Sequenzen durch PCR, Klonierungsarbeiten mit anschließender Sequenzierung führt, wenn diese quantitativ  $< 10 \%$  der Gesamt-DNA ausmachen (Cooreman et al., J. Biomed. Sci. 8: 237-247 (2001)).

Demnach ist die Isolierung von Mutanten vorteilhaft, wobei die sich anschließende Identifizierung und Charakterisierung einzelner Mutanten möglicherweise zu verbesserten Vakzinen und Diagnostika führt.

Die Immunantwort nach einer Infektion mit HBV ist hauptsächlich gegen die sogenannte a-Determinante als eine allen Hepatitis B Viren gemeinsame Region des S-Proteins gerichtet, die sich auf der Oberfläche der Viruspartikel befindet (Gerlich et al., supra) und die den heterogensten Teil der B-Zell-Epitope des S-Gens darstellen.

Als Bindestellen für Antikörper werden nach heutigem Kenntnisstand insgesamt mindestens 5 sich teilweise überlappende Epitope auf der a-Determinante zwischen Aminosäure-Position 101 und 180 angenommen (Abb. 1 und 2) wie durch die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gezeigt werden konnte (Peterson et al., J. Immunol. 132: 920-927 (1984)).

Es handelt sich hauptsächlich um komplexe Konformations-Epitope, die durch mehrere Disulfid-Brücken stabilisiert werden. Teilweise liegen auch Sequenz-Epitope vor, die mit Hilfe synthetisch hergestellter zyklischer Peptid-Strukturen dargestellt werden können.

Sogenannte „schützende Antikörper“, die nach einer natürlichen Infektion mit HBV im Serum zirkulieren, sind zu 99% gegen die sehr immunogene a-Determinante des HBV gerichtet (Jilg, Vaccine 16: 65-68 (1998)).

Auf diese Tatsache stützt sich die breite Anwendung der Immunisierung mit Vakzinen, die entweder aus Humanserum isoliert oder gentechnologisch hergestellt wurden und die Verabreichung von Hepatitis B Immunglobulinen, die humane HBV-spezifische Antikörper enthalten. Beide prophylaktischen Strategien beruhen auf dem neutralisierenden Effekt, die HBs-spezifische Antikörper nach Bindung an die „a-Loop-Epitope“ entfalten (Carman et al., Hepatology 24: 489-493 (1996), Muller et al., J. Hepatol. 13: 90-96 (1991) und Samuel et al., N. Engl. J. Med. 329: 1842-1847 (1993)).

Ähnlich beruhen die heute weit verbreiteten Diagnostika auf der Bindung von a-Determinanten-spezifischen Antikörpern mit Epitopen der a-Determinante.

So wird bei der im Blutspendewesen weltweit angewendeten HBsAg-Bestimmung mit immunchemischen Bestimmungsmethoden im Serum von Spendern zirkulierendes HBV Oberflächenantigen mit Antikörpern gegen die a-Determinante (polyklonal oder monoklonalen Ursprungs) nachgewiesen und bei positivem Resultat die entsprechende Blutspende verworfen, um iatrogene HBV Infektionen durch HBV-kontaminiertes Blut zu verhindern. Eine weitere Anwendung der HBsAg-Bestimmung liegt im Nachweis einer vorliegenden akuten HBV-Infektion.

Umgekehrt wird mit der Bestimmung von HBs-spezifischen Antikörpern im Blut von Probanden mit einem positiven Bestimmungsergebnis von HBsAg-spezifischen Antikörpern (Anti-HBs) nachgewiesen, daß entweder eine natürliche Infektion abgelaufen oder daß eine durchgeführte Vakzinierung erfolgreich verlaufen ist.

Schließlich beruht auch die Nukleinsäure-Testung z.B. mit Hilfe der Polymerase-Chain-Rektion (PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion) auf der Verwendung von Primern (Starter), die für die HBV Nukleotide spezifisch sind.

Auf Grund der zentralen Rolle, die die a-Determinante bei der aktiven Immunisierung (Vakzinierung mit HBV Antigen), der passiven Immunisierung (Schutz durch HBV-spezifische Immunglobuline), dem Nachweis von Impferfolg bzw. stattgefundener HBV Infektion (beides mittels Bestimmung von HBsAg-spezifischen Antikörpern, Anti-HBs) und schließlich der Sicherheit im Blutspendewesen (HBsAg-Bestimmung und

PCR), ist verständlich, daß in Fachkreisen das Auftreten von Mutanten und auch neuen Varianten mit großer Aufmerksamkeit verfolgt wird.

Als Konsequenz könnten in der a-Determinante des HBV veränderte aber replikationsfähige neue Mutanten und/oder Varianten sowohl das prophylaktische als auch das diagnostische Konzept unterlaufen (Brind et al., J. Hepatol. 26: 228-235 (1997), Fischer et al., Transplant Proc. 31: 492-493 (1999), Ghany et al., Hepatology 27: 213-222 (1998), Protzer-Knolle et al., Hepatology 27: 254-263 (1998), Carman et al., Gastroenterology 102: 711-719 (1992) und Coleman et al., WO 02/079217 A1, (2002)).

Die Abgrenzung von Varianten und Mutanten des HBV ist nicht scharf, wobei ein diesbezüglicher Vorschlag breite Anwendung findet (Carman, J. Viral Hepat. 4 (suppl.1): 11-20 (1997). Dem zu Folge sollte die Bezeichnung „Variante“ für natürlicherweise vorkommende Subtypen angewendet werden, die ohne bekannte Interferenz durch Selektionsdruck (antivirale Therapie und / oder Immunglobulin-Gabe) auftreten und ein geographisches Verteilungsmuster aufweisen.

Die Charakterisierung und anschließende Klassifizierung der Subtypen erfolgt mit Hilfe monoklonaler Antikörper und basiert auf einem veränderten Reaktionsmuster auf Grund des Austausches von einer oder wenigen Aminosäure(n). Die Grundlage der Klassifizierung stellen die Aminosäurepositionen 122 oder 160 der verbreitetsten HBV Sequenz dar: aa 122 und aa 160 = Lysin, K.

Alle Serotypen enthalten die Gruppen-spezifische a-Determinante, während die aa 122 und zusätzlich 133 und 134 den d- bzw. r-Subtyp und aa 160 die Zugehörigkeit zum w- bzw r-Subtyp bestimmen. Auf dieser Basis lassen sich HBV Subtypen grob in adr, adw, ayr oder ayw einteilen, die sich weiter in mindestens 9 Sub-Subtypen unterscheiden lassen: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adwr2, adw4, adrq+ und adrq- (Swenson et al., J. Virol. Meth. 33: 27-28 (1991), Blitz et al. J. Clin. Microbiol. 36: 648-651, Ashton-Rickardt et al., J. Med. Virol. 29: 204-214 (1989)).

Da diese Klassifizierung eine serologische Reaktivität zur Grundlage macht, muß nicht jede Typisierung notwendigerweise eine Variabilität auf der Aminosäure-Ebene bedeuten, weshalb dem Genotyping auf der S-Gen-Ebene der Vorzug gegeben wird (Ohba et al., Virus Res. 39: 25-34, (1995).

Subtypen treten aus noch nicht bekannten Gründen in bestimmten geographischen und ethnischen Mustern auf.

Die Bezeichnung Mutation sollte nach Carman Varianten vorbehalten bleiben, die ausschließlich unter Selektionsdruck wie Vakzinierung oder antivirale Therapie entstehen. Es sind bereits viele Mutationen beschrieben worden, von denen manche zu diagnostisch falschen Befundungen führten (Carman et al., Lancet 345: 1406-1407) und von denen die nachstehend genannten aa-Austausche beispielhaft zitiert werden:

Consensus:	aa-Position	Mutante:
I	110	V
P	111	T
T	114	S
T	116	S
P	120	T / S
T	123	A / N
I/T	126	A / S
Q	129	H / R
K/M	133	L
T	143	M / L
D	144	H / A / E
G	145	R / A
A	157	R

sowie

Cystein Austausche in den aa-Positionen 107, 124, 137, 147 & 149.



(Coleman, supra; Okamoto et al., *Pediatr. Res.* 32: 264-268 (1992); Zhang et al., *Scand. J. Infect. Dis.* 28: 9-15 (1996); Zuckermann et al., *Lancet* 343: 737-738 (1994)).

Überraschend wurde in einer Humanprobe eines an Leberentzündung erkrankten ägyptischen Patienten (interne Nummer: 118234, Entnahme vom 02. Okt. 2002) ein atypisches Reaktionsmuster von Hepatitis-Markern gefunden.

Neben dem Krankheitsbild mit Erhöhung der für eine derartige Infektion typischen Leberwerte weisen auch nachgewiesene Hepatitis Core Antikörper der IgM-Klasse auf eine akute HBV-Infektion hin, ohne daß allerdings der HBsAg-Nachweis mit einem zugelassenen leistungsstarken HBsAg-ELISA gelang.

Eine durchgeführte PCR ergab überraschend ein positives Resultat und das Sequenzierungsergebnis führte völlig überraschend zu den in Abb. 3 und 4 dargestellten Nukleotid-Sequenzen und den in Abb. 5 und 6 abgebildeten Aminosäure-Sequenzen.

Aus diesen Sequenzen wird deutlich, daß es sich völlig überraschend nicht um eine Punktmutation, d.h. Austausch weniger Nukleotide und auch nicht um einen möglicherweise serologisch zu charakterisierenden Subtyp handelt, da insgesamt n=11 Aminosäuren in der Region von aa 96 bis 180 gegenüber dem Genotyp D substituiert vorliegen. Im Hinblick auf die Häufigkeit der Aminosäure-Substitutionen ist völlig überraschend davon auszugehen, daß es sich um einen neuen Wildtyp handelt oder daß die Mutationen so ausgeprägt sind, daß die Konsequenz eher als neue Variante zu beschreiben ist, die im Folgenden als HDB 11-Variante bezeichnet wird.

Die Analyse der besten Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der a-Determinante mit bekannten Sequenzen verweist auf Genotyp D (Abb. 1), Subtyp ayw2 (Abb. 2) von dem sich die neue Variante überraschend allerdings noch in 11 aa-Positionen unterscheidet. Prominentestes Merkmal sind die 10 Substitutionen in der Region zwischen aa 103 und 136 gemäß Abb. 1, 5 und 6.

Selbst wenn man die Möglichkeit berücksichtigt, daß eine Koexistenz der neuen HDB 11-Variante mit einem bekannten Wildtyp vorliegt, bleibt als überraschendes Merkmal die charakteristische und neue Sequenz in der Aminosäure-Region aa 114 bis 120 bestehen, die mit 6 neuen Aminosäure-Sequenzen/-Substitutionen zu beschreiben ist (Abb. 1).

Die vorliegende Erfindung umfaßt eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die zu mindestens 65 % mit SEQ ID No. 1 identisch ist bzw. mit einem Fragment dieser in Abb. 3 und 4 dargestellten Sequenz, das spezifisch zum Komplement der SEQ ID No: 1 bis 11 hybridisiert.

Zusätzlich beinhaltet die vorliegende Erfindung eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die die vorliegende erfindungsgemäße Variante der a-Determinante des Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) in den Aminosäuren-Positionen zwischen aa 101 und 180 kodiert bzw. zu einem Peptid-Produkt führt, das in der aa-Sequenz zu mindestens 65 % mit der in Abb. 5 und 6 dargestellten SEQ ID No: 12 übereinstimmt oder Fragmenten davon gemäß SEQ ID No: 13 bis 30.

Des weiteren beinhaltet die vorliegende Erfindung einen Vektor, umfassend eine oder mehrere der genannten Nukleotid-Sequenzen wie auch eine Wirtszelle, die diesen Vektor enthält und eine Methode zur Darstellung eines entsprechenden Polypeptides aus der a-Determinante, umfassend die Inkubation der oben genannten Wirtszelle über Zeiten und unter Bedingungen, die für die Expression des Polypeptides erforderlich sind.

Auch Gegenstand der Erfindung sind Antikörper, die mit der in SEQ ID No: 11 bis 30 beschriebenen a-Determinante reagieren, wobei die Bindung bevorzugt in dem Aminosäurebereich aa 101 bis 150 erfolgt. Die Antikörper können polyklonalen oder monoklonalen tierischen oder menschlichen Ursprungs sein.

Eine isolierte HBV Variante ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung, wobei das Virus eine a-Determinante aufweist, die den aa-Sequenzen mindestens zwischen Position

101 und 120 und/oder aa 121 bis 140 entspricht, idealerweise beiden genannten Regionen zwischen 101 und 140.

Auch eine immunogene Mischung zur Erzeugung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfassend das beschriebene isolierte HBV oder ein bzw. mehrere der beschriebenen Polypeptide.

Die Erfindung beinhaltet auch eine Polynukleotid-Sonde, enthaltend eine HBV Genom-Sequenz, welche durch Substitution von Aminosäuren zu einer modifizierten a-Determinanten führt, die mit der beschriebenen aa-Sequenz der neuen HBV-Variante identisch ist oder zu mindestens 65 % entspricht.

Auch Kits zum Nachweis von Polynukleotiden der HBV-Variante mit Hilfe der genannten Sonde wie auch Kits zum Nachweis von HBsAg der Variante bzw. einzelnen Epitopen davon und Antikörper, die für die Variante oder Epitope davon spezifisch sind, sind ebenso Gegenstand der Erfindung, wie die Methoden des Nachweises von Polynukleotiden, Antigen und Antikörper, umfassend eine Inkubation zur Bildung entsprechender Komplexe und Nachweis dieser Komplexe durch geeignete dem Fachmann bekannte Verfahren.

Die Ausführungsformen dieser Kits und Nachweismethoden können zum spezifischen und alleinigen Nachweis von Nukleotiden und Antigen der HBV-Variante bzw. dagegen gerichteter Antikörper ausgelegt sein oder supplementär, d.h. den zusätzlichen Nachweis der erfindungsgemäßen Varianten-Analyten zu derzeitig bekannten HBV-Nucleotiden, - Antigenen bzw. - Antikörpern gestatten.

Analog kann eine immunogene Mischung von erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen auch in Verbindung mit bekannten Antigenen z.B. für die Verbesserung der Wirksamkeit einer Vakzine angewendet werden.

Die vorliegende Erfindung ist darüber hinaus in den Patentansprüchen beschrieben.

Beschreibung der Abbildungen:

**Abb. 1** stellt eine Übersicht der Aminosäure-Sequenzen der a-Determinante von 6 beschriebenen Genotypen des HBV im Vergleich zu HDB 11 dar.

In **Abb. 2** sind die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen der a-Determinante sowie unmittelbar benachbarter Regionen des Genotyps D, Subtyp ayw2 von HBV dargestellt.

**Abb. 3** bildet die Nukleotid-Sequenz der a-Determinante des HBV surface Antigens für Subtyp ayw2 des Genotyps D von HBV ab im Vergleich zur Nukleotid-Sequenz von HDB 11.

**Abb. 4** faßt die Translations-relevanten Abweichungen der Nukleotid-Sequenz von HDB 11 zusammen.

In **Abb. 5** wird die Nukleotid-Sequenz von HDB 11 in der Region der a-Determinante sowie die entsprechende Aminosäure-Sequenz dargestellt. Die a-Determinante befindet sich zwischen Aminosäure No. 101 und 180 des kleinen HBsAg (Small, S).

**Abb. 6** stellt die entsprechende Polypeptid-Sequenz der a-Determinante von HDB 11, die von der in Abb. 5 beschriebenen Nukleotid-Sequenz kodiert wird.

Die vorliegende Erfindung beschreibt eine neue Variante des Hepatitis B Virus (HBV), die eine völlig neue a-Determinante als Resultat von Aminosäure-Austauschen in den nachfolgenden aa-Positionen der S-HBsAg Sequenz aufweist. Für die Beschreibung der Aminosäuren wird der 1-Buchstaben-Code verwendet:

aa von HDB 11      aa-Position      aa von ayw2/Genotyp D

I	103	M
A	114	S
I	115	T
N	116	T
N	117	S
R	118	T
Q	120	P
T	127	P
H	129	Q
Y	136	S

Außerdem liegt in Position aa 96 von HDB 11 Alanin (A) statt Valin (V) vor:

A	96	V
---	----	---

Diese aa-Substitutionen lassen sich auf entsprechende Nukleotid-Substitutionen der entsprechenden Codons zurückführen.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die für die a-Determinante des Virus kodiert (Abb. 3 sowie SEQ ID No.: 1).

Die Erfindung umfaßt auch Nukleotide mit mindestens 65 % Übereinstimmung, bevorzugt mindestens 75 % Übereinstimmung und besonders bevorzugt mit mindestens 90 % Übereinstimmung mit der Nukleotid-Sequenz der vorliegenden Erfindung bzw. Fragmenten davon sowie dazu komplementäre Sequenzen.

Übereinstimmung ist definiert als Grad der Gleichheit, Entsprechung oder Äquivalenz zwischen zwei gleichen Strängen von zwei DNA Segmenten (Lesung entweder 5' → 3'/sense oder 3' → 5'/antisense). Ausgedrückt wird die Übereinstimmung als prozentualer Wert, indem die Anzahl identischer Basen zweier zu vergleichender Sequenzen geteilt durch die Länge der kürzeren Sequenz und mit 100 multipliziert wird wobei der größere Wert der größten Übereinstimmung entspricht (Smith et al., Adv. Appl. Mathem. 2: 482-489 (1981)).

Diese Bewertung ist auch auf aa-Sequenzen von Peptiden und Proteinen anwendbar (Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O Dayhoff ed. 5 Suppl. 3: 353-358, Nat. Biom. Res. Found., Washington D.C., USA; Gribskov, Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745-66763 (1986)).

Dem Fachmann ist geläufig, daß es neben dem sogenannten BestFit-Programm der Genetic Computer Group (Madison, WI) mehrere analoge Auswerteprogramme zur Ermittlung des Übereinstimmungsgrades gibt.

Unter Komplementarität versteht man die Ausprägung der Bindefähigkeit zweier DNA Segmente. Bestimmt wird diese Größe, indem die Fähigkeit eines sense-Stranges gemessen wird, mit einem antisense-Strang eines anderen DNA-Segments zu hybridisieren, d.h. eine Doppelhelix zu bilden. Je ausgeprägter die Komplementarität zwischen zwei Nukleotidsequenzen von zwei DNA-Strängen ist, desto stärker wird die Ausbildung von Hybrid-Duplex-Strukturen sein.

Die Erfindung umfaßt auch Polypeptide, die von oben beschriebenen Nukleotid-Sequenzen kodiert werden, insbesondere solche Aminosäuresequenzen, die die a-Determinante des HBsAg bestimmen und Polypeptide, die mindestens eine Ähnlichkeit von 65 %, bevorzugt 75 % und noch bevorzugter 95 % zu diesen Sequenzen aufweisen.

Der Begriff Ähnlichkeit zwischen Aminosäure-Sequenzen ist definiert als das Vorliegen von identischen Aminosäuren in zwei zu vergleichenden Polypeptiden. Bestimmt wird die prozentuale Ähnlichkeit zweier Polypeptide mit dem Fachmann geläufigen

Methoden, wobei ein hoher Prozentwert eine hohe Entsprechung, Gleichheit oder Äquivalenz zweier Sequenzen bedeutet.

Für die Beschreibung der vorliegenden Erfindung wird unter einem Nukleotid-Fragment eine konsequente Folge von mindestens 9, bevorzugt 9-15, besonders bevorzugt 15-21 und sogar ganz besonders bevorzugt 21-60 Nukleotide aus der Nukleotidsequenz der neuen HBV-Variante verstanden, wobei auch Mischungen derartiger Nukleotid-Fragmente naheliegen.

Ein Polypeptid-Fragment wird als Folge von mindestens 3, bevorzugt 3-5, besonders bevorzugt 5-7 und sogar ganz besonders bevorzugt 7-20 Aminosäuren aus der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV-Variante verstanden, wobei auch Mischungen derartiger Polypeptid-Fragmente unter diese Erfindung fallen.

Unter die vorliegende Erfindung fällt auch eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die hybridisierbar ist und zu Nukleotid-Sequenzen führt, die den Nukleotidsequenzen des HBsAg der neuen HBV Variante oder Teilen der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV Variante entsprechen, komplementär dazu sind oder als Subtyp oder Mutation auf HDB 11 zurückzuführen sind.

Es ist für den Fachmann naheliegend, daß eine Nukleotidsequenz nach deren Isolierung nach Methoden gemäß Stand der Technik in prokaryontische (z.B. E. coli), eukaryontische Wirtszellen (z.B. Chinese Hamster Ovary Cell) oder Hefe (z.B. S. Cerevisiae) mit Hilfe eines Vektors oder Konstruktes eingebracht werden können (mit dem Fachmann bekannten Methoden wie z.B. Transfektion, Transformation oder Elektroporation: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Vol: 1-3, ed Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), wobei transiente oder permanente Kulturen angewendet werden können.

Demzufolge umfaßt die vorliegende Erfindung isolierte Nukleotidsequenzen der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV Variante, Polypeptide, die durch diese Nukleotide kodiert werden, Vektoren, die Nukleotidsequenzen der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV Variante enthalten wie auch die Wirtszelle, in die ein Vektor gebracht wird.

Neben der Darstellung von Polypeptiden mit Hilfe eines Expressions-Systems (rekombinant oder gentechnologisch) ist es naheliegend, dass analoge Polypeptid-Strukturen auch vollsynthetisch hergestellt werden oder direkt durch Reinigung aus der Virusvariante.

Es ist für den Fachmann ebenso naheliegend, die Polypeptide oder Proteine der neuen HBV Variante zur Erzeugung von monoklonalen und/oder polyklonalen Antikörpern zu verwenden, die immunologisch an Bindestellen (Epitope) der a-Determinantender neuen HBV Variante binden. Die Methoden zur Darstellung von Antikörpern sind dem Fachmann bekannt (z.B. Koehler et al., Nature 256-494 (1975), Mimms et al., Vi. 176: 604-619 (1990)).

Ferner ist es naheliegend, die a-Determinante der erfindungsgemäßen HDB 11-Variante in Form der gesamten Polypeptidsequenz oder Teilen davon für die Bestimmung von gegen die HBV Variante gerichteten Antikörpern zu verwenden: Anti-HBs-Antikörper.

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Bestimmungsmethoden geläufig, bei denen mit Polypeptiden aus der a-Determinante der HBV Variante und Antikörpern tierischen oder menschlichen Ursprungs Immunkomplexe gebildet oder deren Bildung gehemmt werden.

Eine spezielle Ausführung stellt der sogenannte Enzymimmunoassay dar, von dem ein mögliches Testprinzip im folgenden beispielhaft beschrieben wird, ohne jedoch die erfindungsgemäße Idee darauf einzuschränken:

Bei dem sehr weit verbreiteten sogenannten Sandwich-Prinzip werden auf einem geeigneten Träger (z.B. Mikropartikel oder Oberfläche von Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte) immobilisierte Epitop-tragende Polypeptid- oder Protein-Sequenzen mit der Untersuchungsprobe inkubiert. An die Epitope gebundene Antikörper werden nach entfernen überschüssiger Probe detektiert, indem eine weitere Inkubation erfolgt mit Epitop-tragenden Polypeptid- oder Protein-Sequenzen, die mit einer Sonde versehen sind. Als Sonde wird häufig ein Enzym eingesetzt, dessen katalytische



Umsetzung (nach Entfernen des überschüssigen Reagenzes) eines geeigneten Substrates zu einer Farbreaktion führt, die photometrisch gemessen wird und deren Intensität dem in der Probe vorhandenen Antikörpergehalt proportional ist.

Neben dieser speziellen Ausführungsform sind auch Methoden bekannt, die homogener Natur sind (d.h. keine bound/free Trennung erfordern), die ganz ohne Sonde auskommen (z.B. Agglutinationsverfahren), mit bloßem Auge auswertbar sind (z.B. radiale Immundiffusion) oder sich anderer Sonden (z.B. radioaktive Isotope oder Chemilumineszenz) bzw. mehrerer Sonden bedienen (wie z.B. Das Biotin/Streptavidin-System).

Ebenso können die Polypeptidstrukturen der HBV Variante durch anti-idiotypische Antikörper dargestellt werden oder durch Wahl eines geeigneten Testprinzips auch Varianten-spezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper zur Bestimmung von Anti-HBs-Antikörpern (z.B. in einem kompetitiven Testformat) herangezogen werden. Es ist ebenso bekannt, daß durch Wahl des Testprinzips auch eine Differenzierung der Immunglobulin-Klassen erfolgen kann (z.B. durch das „indirekte“ Verfahren mit einem zweiten Klassen-spezifischen Antikörper (z.B. IgG oder IgM spezifisch) mit Sonde oder mit Hilfe des sogenannten Anti- $\mu$ -Prinzips (IgM spezifisch). Natürlich müssen die Methoden und Materialien (inkl. Sonde und Polypeptidsequenzen) dem jeweiligen Ziel angepaßt werden.

All diese Ausführungsformen entsprechen dem Stand der Technik, so dass unter „Bestimmung von Antikörpern, die für die a-Determinante der neuen HDB 11-Variante spezifisch sind“ mit der vorliegenden Erfindung alle Verfahren verstanden werden, die sich zum Nachweis von Immunglobulinen und/oder Immunglobulin-Klassen gegen die neue HBV Variante eignen, ungeachtet ob alleine der Antikörper gegen die neue Variante gesucht wird oder in Verbindung mit Antikörpern gegen bekannte a-Determinanten und / oder bekannte Mutationen in der a-Region.

Schließlich ist es ebenso naheliegend, monoklonale oder polyklonale Antikörper (oder Mischungen bzw. Fragmente davon oder Mischungen von Fragmenten), die mit Epitopen der neuen HBV Variante reagieren, dazu zu verwenden, die a-Determi-

nante der erfindungsgemäßen HBV Variante in Form der gesamten Polypeptidsequenz oder Teilen davon in Untersuchungsproben zu bestimmen: HBsAg der HDB 11-Variante.

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Bestimmungsmethoden geläufig, bei denen mit einem oder mehreren monoklonalen Antikörper(n) oder polyklonalen Antikörpern (oder Mischungen davon bzw. Fragmenten oder Mischungen von Fragmenten), die spezifisch für die a-Determinante der HBV Variante sind, Immunkomplexe gebildet oder deren Bildung gehemmt werden.

Eine spezielle Ausführung stellt der sogenannte Enzymimmunoassay dar, von dem ein mögliches Testprinzip im folgenden beispielhaft beschrieben wird, ohne jedoch die erfindungsgemäße Idee darauf zu beschränken:

Bei dem sehr weit verbreiteten sogenannten Sandwich-Prinzip werden auf einem geeigneten Träger (z.B. Mikropartikel oder Oberfläche von Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte) immobilisierte Antikörper oder Fragmente davon mit der Untersuchungsprobe inkubiert. An die Antikörper gebundenes HBsAg wird nach Entfernen überschüssiger Probe detektiert, indem eine weitere Inkubation erfolgt mit Anti-HBs-Antikörpern (monoklonal oder polyklonal oder Fragmente bzw. Mischungen dieser Fragmente), die mit einer Sonde versehen sind. Als Sonde wird häufig ein Enzym eingesetzt, dessen katalytische Umsetzung (nach Entfernen des überschüssigen Reagenzes) eines geeigneten Substrates zu einer Farbreaktion führt, die photometrisch gemessen wird und deren Intensität dem in der Probe vorhandenen Antikörpergehalt proportional ist.

Neben dieser speziellen Ausführungsform sind auch Methoden bekannt, die homogener Natur sind (d.h. keine bound/free Trennung erfordern), die ganz ohne Sonde auskommen (z.B. Agglutinationsverfahren), mit bloßem Auge auswertbar sind (z.B. radiale Immundiffusion) oder sich anderer Sonden (z.B. radioaktive Isotope oder Chemilumineszenz) bzw. mehrerer Sonden bedienen (wie z.B. Das Biotin/Streptavidin-System).

All diese Ausführungsformen entsprechen dem Stand der Technik, so dass unter „Bestimmung von HBsAg der neuen HBV Variante“ mit der vorliegenden Erfindung alle Verfahren verstanden werden, die sich zum Nachweis von Polypeptidsequenzen oder Antigenen der neuen HBV Variante eignen, ungeachtet ob alleine das HBsAg der neuen Variante bestimmt wird oder in Verbindung mit HBsAg von bekannten a-Determinanten und/oder bekannten Mutationen in der a-Region.

Ebenso ist es naheliegend, aus ökonomischen Gründen eine HBsAg-Bestimmung mit einer Nachweismethode gegen einen weiteren Analyten (z.B. HIV-Antigen oder die gleichzeitige Bestimmung von HBV Varianten-HBsAg und dagegen gerichtete spezifische Antikörper) in einem Testansatz (differenzierend oder nicht-differenzierend) zu kombinieren.

In bezug auf Nukleinsäure-test (NAT) ist es naheliegend, Nukleotid-Sequenzen der vorliegenden Erfindung zu verwenden, um DNA- Oligomere von 6-8 Nukleotiden oder größer herzustellen, die geeignet sind, als Hybridisierungssonden das virale Genom der hier beschriebenen HBV Variante in Personen nachzuweisen, die verdächtigt werden, die Virus-Variante zu tragen oder z.B. im Blutspendewesen Blutkonserven auf Vorhandensein des Varianten-Genoms entweder gezielt oder in Kombination mit dem Nachweis von Nukleotidsequenzen bekannter HBV Varianten und/oder HBV-Mutanten zu screenen.

Ebenso können auf Basis der gefundenen Nukleotidsequenzen der neuen HBV Variante entsprechende Primer entwickelt werden.

Ferner schließt die Erfindung auch eine Vakzine ein umfassend ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung und ein gebräuchliches Adjuvans (z.B. Freund'sches adjuvans, Phosphat-gepufferte Saline o.ä.). Eine derartige Vakzine kann dazu verwendet werden, um die Bildung von Antikörpern in Säugetieren anzuregen. Ähnlich umfaßt die Erfindung ein Partikel, das eine Nicht-Varianten spezifische Aminosäure-Sequenz beinhaltet, die eine Partikel-Formation induziert zusammen mit einem Epitop-enthaltenden Polypeptid, das spezifisch für die erfindungsgemäße HBV Variante ist.

Schließlich sind auch diagnostische Reagenzien als Kits Gegenstand der Erfindung, die basierend auf den oben beschriebenen Verfahren einen Nachweis von HBV Varianten- spezifischem Antigen (HBsAg) oder dagegen gerichtete Antikörper (Anti-HBs), entweder als singuläre Bestimmungen oder miteinander oder mit anderen bekannten HBV-Antigen bzw. spezifisch damit reagierenden Antikörpern bzw. auch mit ganz anderen Analyten kombinierbar.

Zusätzlich können die vorliegenden Nukleotidsequenzen benutzt werden, um Primer und/oder Sonden herzustellen, weshalb auch Kits, enthaltend Primer und/oder Sonden zum Nachweis von HBV Varianten-spezifischer Nukleinsäure entweder alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV Nukleotidsequenzen in Untersuchungsproben ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Nukleotidsequenzen der Erfindung können auch dazu verwendet werden, sog. Antisense Oligonukleotide darzustellen (ggfs. für therapeutische Zwecke).

Schließlich können auf Basis der vorliegenden Nukleotidsequenzen auch Primer entwickelt werden, die in der sog. Polymerase Chain Reaction Verwendung finden (PCR). Die PCR stellt eine Methode dar, um eine gewünschte Nukleotidsequenz einer Nukleinsäure oder eines Nukleinsäuregemisches zu amplifizieren. Dabei werden die Primer jeweils spezifisch durch eine Polymerase mit der gewünschten Nukleinsäure als Leseraster verlängert. Nach Dissoziation von dem Originalstrang werden neue Primer hybridisiert und wiederum durch die Polymerase verlängert. Durch Wiederholung dieser Zyklen wird eine Anreicherung der gesuchten Zielsequenz-Moleküle erreicht.

Abschließend umfaßt die Erfindung auch Kulturen von Gewebezellen, die mit der HBV Variante infiziert sind ebenso wie die isolierte HBV Variante selbst. Auch eine immunogene Aufbereitung, die die attenuierte oder inaktivierte HDB 11 -Variante von HBV enthält, ist Gegenstand der Erfindung.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung beschreiben, aber nicht auf die beschriebenen Beispiele beschränken.

### **Beispiel 1: HBsAg-Bestimmung mittels Enzymimmunoassay, EIA**

Zur Bestimmung des surface Antigens von HBV, HBsAg im Blut des ägyptischen Patienten wurde der Enzymimmunoassay Enzygnost® HBsAg 5.0 der Fa. Dade Behring GmbH, Marburg Deutschland angewendet.

Es handelt sich um einen in Europa zugelassenen und leistungsfähigen Test, der den Angaben der Packungsbeilage gemäß abgearbeitet wurde.

Das zu Grunde liegende Testprinzip ist ein sogenannter Sandwich Test im Mikrotiterplatten-Format:

100 µl der zu untersuchenden Probe werden in einem Einschritt-Verfahren mit 25 µl Konjugat 1 (monoklonale HBsAg spezifische Antikörper von der Maus, die kovalent mit Biotin markiert sind) und immobilisierten HBsAg-spezifischen polyklonalen Antikörpern vom Schaf in Kontakt gebracht. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C und Entfernen überschüssiger Komponenten durch 4-maliges Waschen der Platten-Kavitäten werden 100 µl Konjugat 2 zugegeben, das aus Streptavidin besteht, an das das Sonden-Enzym Peroxidase kovalent gebunden ist.

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und Entfernen überschüssiger Komponenten durch 4-maliges Waschen der Platten-Kavitäten werden 75 µl Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung zugegeben, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Entwicklung des blau gefärbten Tetramethylbenzidin-Farbstoffes wird durch Zugabe von 75 µl Stopplösung (Schwefelsäure) unterbrochen und der Farbstoff bei 450 nm photometrisch gemessen.

Die Intensität der Farbentwicklung, gemessen an der optischen Dichte (O.D.) ist dem Gehalt der Untersuchungsprobe an HBsAg direkt proportional, wobei ein O.D. Wert von kleiner als dem Grenzwert als HBsAg-negativ bewertet wird. Der Grenzwert ist definiert als der O.D.-Mittelwert der parallel getesteten Kontrolle, negativ (im Testkit enthalten), zu dem ein konstanter Betrag von 0,05 O.D. addiert wird.

Die Nachweisgrenzen des zur Untersuchung herangezogenen Lots (# 32874) wurden mit den international akzeptierten Standardpräparationen des Paul-Ehrlich-Insti-

tutes, Langen Deutschland zu 0,012 ng ad-Subtyp/ ml bzw. 0,015 ng ay-Subtyp / ml in parallelen Versuchsansätzen aus Testungen von Verdünnungen der Standardpräparationen in HBsAg-negativem Serum durch graphische Interpolation ermittelt.

Die Untersuchung der Probe # 118234 (Entnahme vom 02. Okt. 2002, aus der auch die DNA-Isolierung vorgenommen wurde) brachte in 2 unabhängigen Versuchen an zwei verschiedenen Tagen Ergebnisse von 0,04 und 0,05 O.D., die den Kriterien des Testes entsprechend als HBsAg-negativ zu interpretieren sind. Die mitgeführte Kontrolle, positiv (im Testkit enthalten) war dagegen ebenso positiv (Validierungskriterien erfüllt) wie die erwähnten ad- und ay-Standardpräparationen.

#### **Beispiel 2: Isolierung der HDB 11- DNA aus Probe # 118234**

Aus einem 200 µl-Aliquot der ägyptischen Probe wurde die DNA isoliert, indem der QIA amp® DNA Blood Mini Kit der Fa. Qiagen, Hilden Deutschland) angewendet wurde. Dabei wurden alle Verfahrensschritte wie in der Packungsbeilage beschrieben befolgt und die Elution in einem Volumen von 50 µl vorgenommen.

#### **Beispiel 3: Polymerase Ketten Reaktion, PCR**

##### **3.1 HBV Primer**

Die vier nachstehenden HBV Primer wurden verwendet:

Primer 1 mit der 5' > 3'- Sequenz: GGGTCACCATATTCTTGGGAAC

Primer 2 mit der 5' > 3'- Sequenz: TATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG

Primer 3 mit der 5' > 3'- Sequenz: GACTCGTGGTGGACTTCTCTC

Primer 4 mit der 5' > 3'- Sequenz: TACAGACTTGGCCCCCAATACC

### 3.2 PCR-Amplifikation

Es wurde eine sogenannte nested PCR amplification des surface Antigens durchgeführt, wobei der Perkin Elmer Ampli Taq ® DNA Polymerase Kit sowie der Thermocycler Gene Amp ® PCR system 9700 der Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, USA verwendet wurde.

Die Nukleotide wurden von der Fa. Amersham Biosciences, UK bezogen.

Für den ersten Amplifikations-Zyklus wurden 5 µl der isolierten DNA unter Verwendung der oben genannten Primer 1 und 2 sowie folgenden Bedingungen amplifiziert:

#### PCR 1 rxn

Primer 1 (10 µM)	1 µl	
Primer 2 (10 µM)	1 µl	
10fach konz. Puffer (incl. 15 µM Mg <sub>2</sub> Cl)	5 µl	
dNTP Mischung (10 µM)	1 µl	
dest. Wasser	36,75 µl	
Ampli Taq (5 U/ µl)	<u>0,25 µl</u>	
Pro Röhrchen	45 µl	Gesamtvolumen
	plus. <u>5 µl</u>	isolierte DNA
	50 µl	Reaktionsvolumen

Der 50 µl-Ansatz wurde unter Verwendung des beschriebenen Thermocyclers unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

94° C, 1 min. / 94°C, 28. sek. – 50° C, 28 sek. – 72 ° C, 38 sek.  
(35. cycles) / 72 ° C, 5 min. / 8 °C soak.

In der zweiten Amplifizierungsrunde wurde 5 µl des ersten PCR Produktes weiter amplifiziert unter Verwendung der HBV Primer 3 und 4 und folgenden Bedingungen:

**PCR 2 rxn**

Primer 3 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	
Primer 4 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	
10 –fach konz. Puffer	5 $\mu$ l	
dNTP Mischung (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	
dest. Wasser	36,75 $\mu$ l	
Ampli Taq (5 U/ $\mu$ l)	<u>0,25 <math>\mu</math>l</u>	
Pro Röhrchen	45 $\mu$ l	Gesamtvolumen
plus	<u>5 <math>\mu</math>l</u>	PCR Produkt v.rxn
	50 $\mu$ l	Reaktionsvolumen:

Dieser PCR 2 -Ansatz wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Thermocyclers amplifiziert , wobei folgende Bedingungen angewendet wurden:

94° C, 1 min. / 94°C, 28 sek. – 55° C, 28 sek. – 72 ° C, 38 sek.  
(35 cycles) / 72 ° C, 5 min. / 8 °C soak.

Abschließend wurde das PCR 2 Produkt elektrophoretisch aufgetrennt (1,5 % Agarose) unter Mitführen geeigneter Molekulargewichtsmarker. Die Bande mit ca. 520 Basenpaaren wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des QIA quick Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen, Hilden Deutschland isoliert .

**Beispiel 4: Sequenzierung von HDB 11**

Das gereinigte PCR Produkt wurde von der Fa. Medigenomix, Martinsried, Deutschland mit Hilfe des ABI 3700 Kapillar Systems sequenziert in Verbindung mit der ABI BigDye Terminator Chemistry Version 1.1. und der ABI Sequencing Analysis Software Version 3.6. unter Verwendung der in Beispiel 3 beschriebenen Primer 3 und 4.



### Sequenzierungs-Ergebnis

Es konnte gezeigt werden, daß das HBsAg der Probe innerhalb des sequenzierten Bereiches die beste Übereinstimmung der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz mit dem Genotyp D, Subtyp ayw2 zeigt, aber in der Region der a-Determinante insgesamt 10 Aminosäure-Substitutionen aufweist (siehe auch Abb. 2 und 5):

#### HDB 11:

#### D, ayw2:

1.)	Ile (I)	gegen	103 Met (M)
2.)	Ala (A)	gegen	114 Ser (S)
3.)	Ile (I)	gegen	115 Thr (T)
4.)	Asn (N)	gegen	116 Thr (T)
5.)	Asn (N)	gegen	117 Ser (S)
6.)	Arg (R)	gegen	118 Thr (T)
7.)	Gln (Q)	gegen	120 Pro (P)
8.)	Thr (T)	gegen	127 Pro (P)
9.)	His (H)	gegen	129 Gln (Q)
10.)	Tyr (Y)	gegen	136 Ser (S)

Zusätzlich liegt eine Aminosäure-Substitution in der Position # 96 vor:

11.)	Ala (A)	gegen	96Val (V)
------	---------	-------	-----------

Diese Ergebnisse wurden in mehreren unabhängigen Versuchen aus verschiedenen Primär-Röhrchen der Blutentnahme vom 02. Okt. 2002 mit den gleichen Sequenzierungs-Ergebnissen reproduziert.

Als einzige Ausnahme wurde in der ersten Analyse die Position aa# 122 als Arg R gelesen, während die zweite Analyse eher für Lys (K) sprach.

Das Nukleotid-Profil läßt beide Interpretationen zu, was allerdings auch Hinweis für das Vorliegen der Koexistenz zweier Hepatitis B Viren mit unterschiedlicher

Subtypisierung (ad bzw. ay) sprechen könnte, aber an der Aminosäure-Sequenz bzw. dem Rückschluß auf das Vorhandensein einer neuen Variante mit oben genannten Aminosäure-Substitutionen nichts ändert.

Dies wird unter anderem aus dem negativen EIA Ergebnis geschlossen, da nennenswerte Mengen zirkulierenden HBsAg bekannter Struktur im Hinblick auf die sehr guten Nachweisgrenzen der angewendeten EIA Bestimmungsmethode in jedem Fall Anlaß zu einem positiven EIA-Ergebnis hätte geben müssen.

## Patentansprüche:

1. Isoliertes Oligo- oder Polynukleotid mit einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID No:1 bis SEQ ID No:11:

### SEQ ID No: 1

127 GGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCACTCCCCAACCTCCAATCAC  
TCACCAACCTCCTGTCCTCCAACCTTGTCTTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT  
ATCATCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGTGGCTCTTCTGGACTAT  
CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAA  
TGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCAGGAACTCTATGTATCCCTACTGTTGCTGTACC  
AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAA  
TTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTTCCCTTTGTT  
CAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGG 588

### SEQ ID No: 2

277 TTCTTGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCA  
GGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAA 360

### SEQ ID No: 3

277 TTCTTGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCA  
GGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGA  
ACC TCTATGTATCCCTACTGTTGCTGTACC 420

### SEQ ID No: 4

301 CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGG  
GGACAATGCAAA 366

### SEQ ID No: 5

301 CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGG  
GGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGTATCCCTACTGT  
TGCTGTACC 420

### SEQ ID No: 6

340 GCAATCAACAACAGG 354

### SEQ ID No: 7

340 GCAATCAACAACAGGGGACAA 360

### SEQ ID No: 8

340 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAA 366

### SEQ ID No: 9

340 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCAC 387

### SEQ ID No: 10

340 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACC

TCTATGTATCCCTACTGTTGCTGTACC 420

SEQ ID No: 11

361 TGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGTATCCCTACTGTTGC  
TGT ACC 420

2. Oligo- oder Polynukleotid gemäß Anspruch 1, das zu jeweils mindestens 65 % oder 66 % oder 67 % oder 68 % oder 69 % oder 70 % oder 71 % oder 72 % oder 73 % oder 74 % oder 75 % oder 76 % oder 77 % oder 78 % oder 79 % oder 80 % oder 81 % oder 82 % oder 83 % oder 84 % oder 85 % oder 86 % oder 87 % oder 88 % oder 89 % oder 90 % oder 91 % oder 92 % oder 93 % oder 94 % oder 95 % oder 96 % oder 97 % oder 98 % oder 99 % mit einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID No:1 bis SEQ ID No:11 identisch ist.
3. Oligo- oder Polynukleotid gemäß Anspruch 1 oder 2, das mit einem Oligo- oder Polynukleotid, welches eine zu einer der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID No:1 bis SEQ ID No:11, komplementäre Sequenz hat, unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
4. Isoliertes Oligo- oder Polynukleotid, welches für HBs-Antigen des Hepatitis B-Virus kodiert und ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält.
5. Fragment eines Oligo- oder Polynukleotids, welches für HBs-Antigen des Hepatitis B-Virus kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß das Fragment ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält.
6. Isoliertes Oligo- oder Polynukleotid, welches für die a-Determinante des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus kodiert und ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält.
7. Primer, der für ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 spezifisch ist.
8. Vektor, der mindestens ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.
9. Wirtszelle, die einen Vektor gemäß Anspruch 8 enthält.
10. Oligo- oder Polypeptid welches durch ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert wird.

11: Isoliertes Oligo- oder Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID No:12 bis SEQ ID No:30 hat:

**SEQ ID No: 12**

43 G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H  
S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F  
I I F L F I L L L C L I F L L A L L D Y  
Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q  
C K T C T T T A H G T S M Y P Y C C C T  
K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K  
F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V  
Q W F V G L S P T V W L S V I W 196

**SEQ ID No: 13**

93 F L L A L L D Y Q G I L P V C P L I P G  
S A I N N R G Q 120

**SEQ ID No: 14**

93 F L L A L L D Y Q G I L P V C P L I P G  
S A I N N R G Q C K T C T T A H G T S  
M Y P Y C C C T 140

**SEQ ID No: 15**

- 101 Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q  
C K 122

**SEQ ID No: 16**

101 Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q  
C K T C T T T A H G T S M Y P Y C C C T 140

**SEQ ID No: 17**

114 A I N N R 118

**SEQ ID No: 18**

110 I P G S A 114

**SEQ ID No: 19**

111 P G S A I 115

**SEQ ID No: 20**

112 G S A I N 116

**SEQ ID No.: 21**

113 S A I N N 117

**SEQ ID No: 22**

115 I N N R G 119

SEQ ID No: 23

116 N N R G Q 120

SEQ ID No: 24

117 N R G Q C 121

SEQ ID No: 25

118 R G Q C K 122

SEQ ID No: 26

114 A I N N R G Q 120

SEQ ID No: 27

114 A I N N R G Q C K 122

SEQ ID No: 28

114 A I N N R G Q C K T C T T T A H 129

SEQ ID No: 29

114 A I N N R G Q C K T C T T T A H G T S M  
Y P Y C C C T 140

SEQ ID No: 30

121 C K T C T T T A H G T S M Y P Y C C C T 140.

12. Oligo- oder Polypeptid gemäß Anspruch 10 oder 11, das zu jeweils mindestens 65 % oder 66 % oder 67 % oder 68 % oder 69 % oder 70 % oder 71 % oder 72 % oder 73 % oder 74 % oder 75 % oder 76 % oder 77 % oder 78 % oder 79 % oder 80 % oder 81 % oder 82 % oder 83 % oder 84 % oder 85 % oder 86 % oder 87 % oder 88 % oder 89 % oder 90 % oder 91 % oder 92 % oder 93 % oder 94 % oder 95 % oder 99 % oder 97 % oder 98 % oder 99 % mit einer der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID No:12 bis SEQ ID No:30, identisch ist.
13. Isoliertes Polypeptid entsprechend der Sequenz des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 enthält.
14. Fragment eines Polypeptids, welches der Sequenz des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus entspricht, dadurch gekennzeichnet, daß das Fragment ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 enthält.

15. Isoliertes Polypeptid, welches für die a-Determinante des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 enthält.
16. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der an HBs-Antigen, enthaltend ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15 bindet, der an HBs-Antigen eines Hepatitis B-Wildtypvirus aber nicht oder wenigstens signifikant schwächer bindet.
17. Ein anti-idiotypischer Antikörper, der eine Aminosäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15 repräsentiert.
18. Testkit zum Nachweis oder zur Bestimmung mittels einer Hybridisierungsreaktion einer Nukleinsäure, die für eine Variante oder Mutante des Hepatitis B-Virus spezifisch ist, unter Verwendung mindestens eines Oligo- oder Polynukleotids gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7.
19. Testkit zum immunchemischen Nachweis oder zur immunchemischen Bestimmung eines Antigens, das für eine Variante oder Mutante des Hepatitis B-Virus spezifisch ist, unter Verwendung mindestens eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers gemäß Anspruch 16.
20. Testkit zum immunchemischen Nachweis oder zur immunchemischen Bestimmung eines gegen eine Variante oder Mutante des Hepatitis B-Virus gerichteten Antikörpers unter Verwendung mindestens eines Oligo- oder Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15.
21. Immunogenes Peptid oder Mischung immunogener Peptide enthaltend ein oder mehrere Oligo- oder Polypeptide gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 3 und 4 alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV-Immunogenen.

## Patentansprüche:

1. Isoliertes Oligo- oder Polynukleotid mit einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID No:1 bis SEQ ID No:11:

### SEQ ID No: 1

127 GGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC  
TCACCAACCTCCTGTCTCCAACCTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTT  
ATCATCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGCTCTTCTGGACTAT  
CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAA  
TGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGCTATCCCTACTGTTGCTGTACAC  
AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAA  
TTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTTCCCTTTGTT  
CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGG 588

### SEQ ID No: 2

2767 TTCTTGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCA  
GGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAA 360

### SEQ ID No: 3

2776 TTCTTGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCA  
GGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGA  
ACC TCTATGCTATCCCTACTGTTGCTGTACAC 420

### SEQ ID No: 4

301 CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGG  
GGACAATGCAAA 366

### SEQ ID No: 5

301 CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGG  
GGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGCTATCCCTACTGT  
TGCTGTACAC 420

### SEQ ID No: 6

3420 GCAATCAACAACAGG 354

### SEQ ID No: 7

3420 GCAATCAACAACAGGGGACAA 360

### SEQ ID No: 8

3420 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAA 366

### SEQ ID No: 9

3420 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCAC 387

### SEQ ID No: 10

3420 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACC  
TCTATGCTATCCCTACTGTTGCTGTACAC 420



**Zusammenfassung:**

**Neue Oberflächenprotein- (HBsAg-) Variante des Hepatitis B Virus**

---

Die Erfindung betrifft Sequenzen einer neuen Variante des Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) und Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren, Antigenen und dagegen gerichteten Antikörpern in Patientenproben.

**Abb. 1: Aminosäuresequenz der HBsAg a-Determinante der verschiedenen HBV Genotypen im Vergleich zur neuen Mutante HDB 11**

Für jeden Genotyp wurde ein repräsentatives Genom zu Grunde gelegt und die aa-Sequenz aus der Nukleotidsequenz abgeleitet

A: X70 185; B: DOO331; C: XO1587; D: X72702, E: X75664; F: X75663; G: FR1

(Stuyver et al.; J. Gen. Virol. 81: 67-74 (2000); Norder et al.; J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992))

aa #	101	111	121	131	141	151	161	170
Genotyp								
A	QGMLPVCPLI	PGSTTTSTGP	CKTCTTPAQG	NSMFPSCCCT	KPTDGNCTCI	PIPSSWAFK	YLWEWASVRF	
B	-----	---S---	-----	T-----	-----	-----	-----	
C	-----	L--TS---	-----	I-----	-----	-----	R F--G---	
D	-----	---S---	---R---	-----	T--Y---	-----	---G- F--A---	
E	-----	---S---	---R---	M-L---	T-----	---S---	---G- F--A---	
F	-----	-----	---R---	L-----	T-----	---S---	---LG- -----	A---
HDB 11	--I-----	---AINNR-Q	-K-----	T-H-	T--Y-Y---	---S---	---G- F--A---	
					(R)			
aa #	103	114	120	129	136	143	159	168

Fett hervorgehoben sind die Aminosäure-Substitutionen, die von dem Wildtyp HBV Genotyp D, ayw2 abweichen

# Abb. 2

Nukleotid-Sequenz des S-Genes des bekannten Wildtyps HBV ayw2 das HBV Oberflächenprotein kodierend (surface antigen, HBsAg) und resultiert aus Aminosäure-4-Sequenz im 3-Buchstaben-Buchstaben-Code (Coleman et al; WO 02/079217 A1)

Fortlaufende Nummerierung Nukleotide (nt) das surface Antigen kodierend (excl. Pre S1- und Pre S2-Region)  
Fortlaufende Nummerierung Aminosäuren (aa) (nt)

1	ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC	60
11	Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe	20
	M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F	
61	TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT	120
21	Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn	40
	L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N	
121	TTT CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180
41	Phe Leu Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His	60
	F L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H	
181	TGA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	240
61	Ser Pro Thr Ser Cys Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe	80
	S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F	
241	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG GTT CTT CTG GAC TAT	300
81	Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Val Leu Leu Asp Tyr	100
	I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y	
301	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA TCA ACC ACC AGC AGC GGA CCC	360
101	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro	120
	Q G M L P V C P L I P G S S T T S T G P	
361	TGC AGA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC TGT ACA	420
121	Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Thr	140
	C R T C T T P A Q G T S M Y P S C C T	
421	AAA CCT TCG GAT GGA AAC TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	480
141	Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys	160
	K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K	
481	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT	540
161	Phe Leu Trp Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Val Pro Phe Val	180
	F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V	
541	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT	600
181	Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr	200
	Q W F V G L S P T V W L S V I W M W Y	
601	TGG GGG CCA AGT CTG TAC TCC ATC TTG AGT CCC TTT TTA CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT	660
201	Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe	220
	W G P P S L Y S I L S P F L P L L P I F F	
661	TGT CTT TGG GTA TAC ATT	678
221	Cys Leu Trp Val Tyr Ile	226
	C L W V Y I	

Nukleotid-Sequenz des HBV surface Antigen kodierenden S-Gens von dem Wildtyp HBV ayw2 (obere Reihe von nt 1 bis nt 588) im Vergleich zu der ab nt 127 bis nt 588 sequenzierten Nukleotid-Sequenz der neuen Variante B 11 (untere Reihe, in der Nukleotidabänderungen fett hervorgehoben und in Klammern gesetzt sind, die Mutation zu keinem Aminosäureaustausch führt)

1	ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC	60
61	TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT	120
121	TTT CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180
	- 127: GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	
181	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	240
	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	
242	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAT	300
	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GCT CTT CTG GAC TAT	
301	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA TCA ACC ACC AGC ACG GGA CCC	360
	CAA GGT ATA TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA (TCT) GCA ATC AAC AAC AGG GGACAA	
361	TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC TGT ACA	420
	TGC AAA ACC TGC ACG ACT ACT GCT CAC GGA ACC TCT ATG TAT CCC TAC TGT TGC TGT (ACC)	
421	AAA CCT TCG GAT GGA AAC TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	480
	AAA CCT TCG (GAC) GGA (AAT) TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	
481	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT	540
	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC (TCC) TGG CTC AGT TTA CTA GTT (CCC) TTT GTT	
541	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT	600
	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG 588	
601	TGG GGG CCA AGT CTG TAC TCC ATC TTG AGT CCC TTT TTA CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT	660
661	TGT CTT TGG GTA TAC ATT 678	

Abb. 4

Nukleotidsequenz des S-Gens der neuen HBV Variante HDB 11:  
nt 127 bis nt 588 des HBV surface Antigen kodierenden Genoms.  
Fett markiert sind nur die Nukleotid-Abweichungen, die zu einer  
veränderten Aminosäure-Sequenz führen.

```
- 127:  GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC. 180
181  TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT 240
241  ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GCT CTT CTG GAC TAT 300
301  CAA GGT ATA TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCT GCA ATC AAC AAC AGG GGACAA 360
361  TGC AAA ACC TGC ACG ACT ACT GCT CAC GGA ACC TCT ATG TAT CCC TAC TGT TGC TGT ACC 420
      (AGA, 364-366)
421  AAA CCT TCG GAC GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA 480
481  TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTT CCC TTT GTT 540
541  CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG 588
```

# Abb. 5

S-Gen Nukleotid-Sequenz (nt 127 bis 588) und entsprechende Aminosäure-Sequenz

(aa 43 bis 196) der neuen HBV Variante HDB 11

(fett und unterstrichen hervorgehoben sind Aminosäuren, die im Vergleich zum Wildtyp HBV ayw2 substituiert vorliegen)

127:	GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180
- aa 43:	G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H	60
181	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	240
61	S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F	80
241	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GCT CTT CTG GAC TAT	300
81	I T F L F I L L L C L I F L L A L L D Y	100
301	CAA GGT ATA TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCT GCA ATC AAC AAC AGG GGACAA	360
101	Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q	120
361	TGC AAA ACC TGC ACG ACT ACT GCT CAC GGA ACC TCT ATG TAT CCC TAC TGT TGC TGT ACC	420
121	C K T C T T A H G T S M Y P Y C C C T	140
	(AGA)	
	(R in a 122)	
421	AAA CCT TCG GAC GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	480
141	K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K	160
481	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTT CCC TTT GTT	540
161	F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V	180
541	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG	588
181	Q W F V G L S P T V W L S V I W	-196

Die folgenden aa sind gegenüber dem Wildtyp HBV ayw2 bei der HDB 11-Variante substituiert (x):  
V 96 (A) (nicht in der Region der a-Determinante),  
M 103 (I), S 114 (A), T 115 (I), T 116 (N), S 117 (N), T 118 (R), P 120 (Q), P 127 (T), Q 129 (H) und  
S 136 (Y) (alle in der Region der a-Determinante)

Abb.6

Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der a-Determinante (aa 90 bis aa 180) der neuen Variante HDB 11 (untere Reihe) mit dem Wildtyp ayw2 (obere Reihe)

aa-Sequenz Wildtyp ayw2																				100	
aa-Sequenz Variante HDB 11:																				Y	
																				Y	
																				Y	
101	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	S	T	T	S	T	G	P	120
	Q	G	I	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	A	I	N	N	R	G	Q	
121	C	R	T	C	T	T	P	A	Q	G	T	S	M	Y	P	S	C	C	C	T	140
	C	K(R)	T	C	T	T	T	A	H	G	T	S	M	Y	P	Y	C	C	C	T	
141	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	K	160
	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	K	
161	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V	180
	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V	

Die folgenden aa sind gegenüber dem Wildtyp HBV ayw2 bei der HDB 11-Variante substituiert (x):  
 V 96 (A) (nicht in der Region der a-Determinante);  
 M 103 (I), S 114 (A), T 115 (I), T 116 (N), S 117 (N), T 118 (R), P 120 (Q), P 127 (T), Q 129 (H) und  
 S 136 (Y) (alle in der Region der a-Determinante)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**